

**SEROLOGISCH NACHWEISBARE B- LYMPHOZYTEN
SPEZIFISCHE ANTIGENE BEIM RIND**

Hans-Ulrich Cichon

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions-und Seuchenmedizin

des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr)

und dem Institut für

Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzuchtforschung e.V. München

(Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr)

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D.O. Schmid

SEROLOGISCH NACHWEISBARE B- LYMPHOZYTEN

SPEZIFISCHE ANTIGENE BEIM RIND

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig- Maximilians-Universität

München

von

Hans -Ulrich Cichon

aus Scheßlitz

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent:	Prof. Dr. D.O. Schmid
Korreferent:	Prof. Dr. E. Dahme

Tag der Promotion:	23. Februar 1979
--------------------	------------------



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Differenzierung von Lymphozyten	3
2.1.1. Differenzierung von T- Lymphozyten	3
2.1.2. Differenzierung von B- Lymphozyten	4
2.1.3. Methoden zur Isolierung von T- Zellen	5
2.1.4. Methoden zur Isolierung von B- Zellen	6
2.2. Methoden zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen	7
3. Eigene Untersuchungen	9
3.1. Tiermaterial	9
3.1.1. Isolierung von Lymphozyten	10
3.1.2. Gewinnung von Isoimmunseren zum Nach- weis von Lymphozytenantigenen	13
3.1.3. Zytotoxischer Test	15
3.1.4. Trennung von B- und T- Zellen des Rindes	17
3.1.4.1. Rosettierung mit Schafererythrozyten	17
3.1.4.2. Trennung in der Nylonwollensäule	19
4. Ergebnisse	22
4.1. Absorption der Isoimmunseren mit Thrombo- zyten	22
4.2. Trennung von B- und T- Lymphozyten	24
4.2.1. Spontanrosettenbildung	25
4.2.2. Trennung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule	26

	Seite
4.3. Serologische Markierung von B- Zellen	29
4.4. Familienuntersuchungen zum Nachweis der Vererbung von B- Zellen spezifischen Antigenen	37
5. Diskussion	38
5.1. Besprechung der technischen Methoden	38
5.2. Besprechung der Ergebnisse	43
6. Zusammenfassung	56
7. Summary	58
8. Literaturverzeichnis	60

1. Einleitung

Bei der Erforschung der Gewebeverträglichkeit und ihrer immunologischen Grundlagen entdeckte DAUSSET (1954) das HLA-Antigensystem des Menschen. Das HLA- Antigensystem ist ein Teil des genetisch determinierten Histokompatibilitätskomplexes des Menschen und umfaßt multiple Allele an fünf Loci (ALBERT et al. 1978)

Bei allen bisher untersuchten Vertebraten wurden genetisch kontrollierte Histokompatibilitätssysteme nachgewiesen, die dem HLA-System des Menschen entsprechen. Koppelungsbeziehungen zwischen Histokompatibilitätsgenen und Genen, die B- Zellen spezifische Antigene kontrollieren, wurden bei kleinen Laboratoriumstieren festgestellt(GREEN 1974, KLEIN 1974).

Es bestehen Anhaltspunkte dafür, daß B- Zellen spezifische Antigene den Ia-Antigenen zuzuordnen sind, die durch Ir-Gene kontrolliert werden.

Diese Ir-Gene (Immune response) sind für die Immunitätsbildung verantwortlich (ALBERT et al.1977)
Beim Menschen wurden Beziehungen zwischen HLA-Antigenen und ganz besonders Antigenen des HLA-D-Locus und bestimmten Krankheiten gefunden (BERTRAMS 1976).
Die Ia-Antigene des Menschen stehen unter der Kontrolle des HLA-D-Locus.

Es kann davon ausgegangen werden, daß auch beim Rind B-Zellen spezifische Antigene den Ia-Antigenen entsprechen und somit als Marker für die Resistenzzucht von Bedeutung sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag über B-Zellen spezifische Antigene des Rindes zu leisten.

2. Literaturübersicht

2.1. Differenzierung von Lymphozyten

Lymphozyten lassen sich in B- und T-Zellen differenzieren. Die B- und T- Zellen unterscheiden sich in ihren Membranrezeptoren (FRUCHTMANN et al.1977, KNAPP 1977), durch ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld (ZEILLER und PASCHER 1973), sowie durch ihre funktionellen Eigenschaften (MITSCHERLICH 1977).

2.1.1. Differenzierung von T- Lymphozyten

Die Differenzierung der T- Zellen geschieht durch den Spontanrosettentest. Auch bovine T- Zellen besitzen an ihrer Oberflächenmembran den Schaferythrozytenrezeptor, der für die Spontanrosettenbildung verantwortlich ist (GREWAL et al.1976, FRUCHTMANN et al. 1977 und TAKASHIMA et al. 1977).

Die Spontanrosettierung wurde auch bei anderen Säugetieren beobachtet (WILSON und COOMBS 1973, BOWLES et al. 1975 und ESCAJADILLO und BINNS 1975).

2.1.2. Differenzierung von B- Lymphozyten

Bovine B- Zellen können durch den Komplementrezeptor charakterisiert werden, der Fc Rezeptor ist zur Charakterisierung von B- Lymphozyten der Rinder nicht geeignet, da nicht alle B- Zellen den Fc Rezeptor besitzen (FRUCHTMANN et al. 1977). B- Zellen bilden mit Schaferythrozyten Rosetten, die als EAC Rosetten bezeichnet werden. Lymphozyten, die sich an mit Antikörpern und Komplement beladene Schaferythrozyten anlagern, bezeichnet man als EAC Rosetten.

MUSCOPLAT et al. (1974), WEILAND und STRAUB (1975) und TAKASHIMA et al. (1977), differenzierten bovine B- Zellen durch Immunfluoreszenz. Dabei wurden Lymphozyten mit einem Fluorescein konjugierten Kaninchen-Anti-Rinderserum inkubiert. Nach Entfernung des Immunglobulins durch Waschen, konnten bovine T- Zellen im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

REEVES und RENSHAW (1978) charakterisierten bovine B- Lymphozyten aus dem Knochenmark durch Immunglobuline der Zelloberfläche und Rosettenbildung

mit Antikörpern beladenen Hühnererythrocyten.

2.1.3. Methoden zu Isolierung von T- Zellen

Lymphozyten, die Spontanrosetten bilden, lassen sich im Dichtegradientenverfahren isolieren. Die Spontanrosetten sedimentieren bei der Zentrifugation (FRUCHTMANN et al.1977). FRUCHTMANN et al.(1977) isolierten T- Zellen nach der Methode von WIGZELL et al.(1972) in einer mit Glasperlen gefüllten Säule. Diese Glasperlen wurden mit Anti- Rinder-Gammaglobulin beladen. Da die B- Zellen die dafür spezifischen Rezeptoren besitzen, wurden sie an die Glasperlen gekoppelt. Die T_H Zellen passierten die Säule und konnten dadurch isoliert werden.

HAMMARSTRÖM et al.(1973), UHLENBRUCK et al.(1973) und GÜRTLER und CLEVE (1978) behandelten humane Lymphozyten zunächst mit Neuraminidase und fraktionierten sie anschließend in einer Helix pomatia-Säule. Das Hämagglutinin aus Helix pomatia bindet selektiv T- Zellen. Mit Entfernung des Helix pomatia Agglutinins aus der Säule können die T-Zellen isoliert werden.

REISNER et al.(1976) behandelten Lymphozyten mit hämagglutinierendem Lectin aus Sojabohnen. Dieses Hämagglutinin führte zur Verklumpung von B- Zellen, die nicht agglutinierten T- Zellen konnten dabei isoliert werden.

Eine Trennung von Lymphozyten in T- und B- Zellen ließ sich auch in einer Nylonwollensäule erreichen (EISEN et al. 1972, JULIUS et al. 1973, GREAVES und BROWN 1974, VAIMAN et al. 1975 und WERNER et al. 1977).

Die B- Lymphozyten haften in der Nylonwolle, die T-Lymphozyten dagegen haften nicht und können aus der Nylonwollensäule ausgespült werden. Diese Methode wurde auch beim Rind eingesetzt(ROUSE und BABIUK 1974, GREWAL et al. 1976 und ROUSE und BABIUK 1977).

2.1.4. Methoden zur Isolierung von B- Zellen

B- Zellen ließen sich als EAC Rosetten im Dichtegradientenverfahren isolieren (FRUCHTMANN et al. 1977).

Beim Rind wurden die B- Zellen in der Nylonwolle von den T- Zellen getrennt (ROUSE und BABIUK 1977). GÜRTLER und CLEVE(1978), haben eine Anreicherung von B- Zellen durch Koppelung an das Lectin aus *Ulex europeus* beschrieben.

2.2. Methoden zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen

BAIN et al. (1963) und BACH und HIRSCHHORN (1964) beschrieben die Technik der gemischten Lymphozytenkultur(MLC). In der Lymphozytenmischkultur (MLC) lassen sich Unterschiede in den Lymphozytenantigenen feststellen, die mit serologischen Methoden nicht nachzuweisen waren. Unterschiedliche Antigene führen zu einer Transformation der Lymphozyten in Lymphoblasten (BAIN et al. 1963 und BACH und HIRSCHHORN 1964).

Die Lymphoblastentransformation wird durch Ia- Antigene bewirkt, die auch an B- Zellen vorhanden sind. Diese MLC- Technik wurde auch zur Antigenanalyse an Rinderlymphozyten eingesetzt(USINGER et al. 1977).

Thrombozyten besitzen an ihrer Membran Antigene, die an allen kernhaltigen Zellen vorhanden sind. B-Zellen spezifische Antigene fehlen an Thrombozyten. Durch Absorption eines Antilymphozytenserums mit Thrombozyten können außer den B- Zellen spezifischen Antikörpern alle anderen Antikörper entfernt werden. Mit derartigen absorbierten Seren ist ein Nachweis B- Zellen spezifischer Antigene möglich. (VAN ROOD et al. 1975 und RICHIARDI et al. 1977).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Tiermaterial

60 Rinder der Rassen Deutsches Fleckvieh, Cholmogoren und Dahomey wurden serologisch auf B- Zellen spezifische Antigene untersucht.

Die Fleckviehherde bestand aus 25 Tieren, die drei verschiedenen Familien angehörten. Zwei der Familien bestanden aus einem Vattertier und fünf Mutter-Nachkommenpaaren. Die dritte Familie setzte sich aus einem Vattertier und einem Mutter-Nachkommenpaar zusammen. Die Abstammung der Jungtiere wurde durch blutgruppenserologische Untersuchungen gesichert.

Außerdem standen Blutproben von 28 Cholmogorenrindern aus der USSR zur Untersuchung auf B- Zellen spezifische Antigene zur Verfügung. Die in vorliegender Arbeit zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen verwendeten Isoimmunseren, waren durch Hauttransplantationen in dieser Cholmogorenherde gewonnen.

Weiterhin bestand die Möglichkeit zur serologischen Untersuchung von sieben Dahomeyrindern aus dem Versuchsbestand des Institutes für Vergleichende Tropenmedizin. Es handelte sich um einen Bullen und zwei Nachkommen mit dem dazugehörigen Muttertier. Die Abstammung wurde blutgruppenserologisch abgesichert. Die restlichen Tiere waren nicht verwandte Einzeltiere.

Zur Gewinnung von Erythrozyten für den Spontanrosettentest standen sechs Merinoschafe zur Verfügung.

3.1.1. Isolierung von Lymphozyten

Zur Isolierung von Rinderlymphozyten mit dem Ziel einer Gewinnung von T- und B- Zellen, wurden 100 ml stabilisiertes Rinderblut benötigt.

Zur Verhinderung einer Gerinnung wurde dem Blut folgender Stabilisator im Verhältnis 1:4 zuge-
setzt:

Natriumchlorid	2.5g
Natriumcitrat	30.0g
Natriumcyanid	0.4g
Streptomycin	0.5g
Aqua dest. ad	1000.0

Das stabilisierte Blut wurde auf einen Uromiro-Gradienten überschichtet und 30 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Das Uromiro-380^(R)¹ wurde zu diesem Zweck auf eine Dichte von 1.076 eingestellt. Die Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten entsprechend ihres spezifischen Gewichtes. Die Lymphozyten und Thrombozyten waren in einem weißen Ring an der Grenzfläche zwischen dem Gradienten und dem Blutplasma angereichert. Dieser Ring wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen, die Zellen in 6 ml physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und 10 Minuten bei 100 g zentrifugiert.

1. Uromiro-380^(R): Bezugsquelle: Dr. Franz Köhler
Chemie, 6146 Alsbach

Bei dieser g-Zahl sedimentierten die Lymphozyten. Der Überstand mit restlichen Thrombozyten und Uromiro wurde verworfen. Im Lymphozytensediment gelegentlich noch verbliebene, einzelne Erythrozyten, wurden durch den Zusatz einer 0.85%igen, wässrigen Ammoniumchloridlösung zehn Minuten hämolysiert. Das Verhältnis zum Zellsediment war 1:10. Die Lymphozyten wurden wiederholt gewaschen und jeweils bei 100 g zentrifugiert.

Zur Einstellung auf eine Zellzahl von 3.0×10^9 Lymphozyten / l wurden die Zellen in physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und anschließend zur Typisierung verwendet.

Zur Isolierung größerer Mengen von Lymphozyten wurden Mesenteriallymphknoten geschlachteter Rinder in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und durch ein Stahlsieb mit der Maschengröße 0.5 mm in eine mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllte Petrischale passiert. Die in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmten Lymphozyten wurden nach der

Methode von HASEGAWA et al.(1973) zur Härtung der Membran mit einer 0.01%igen Jodacetamidlösung vorbehandelt und anschließend auf den Uromiro-Gradienten geschichtet.

3.1.2. Gewinnung von Isoimmunseren zum Nachweis von Lymphozytenantigenen

Zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen wurden neun der durch Hauttransplantationen gewonnenen Isoimmunseren mit Thrombozyten absorbiert. Die Auswahl der Antilymphozytenseren erfolgte aufgrund der Beobachtung während der Voruntersuchung, daß diese Seren neben starken Reaktionen mit einer Zellschädigung von 100% auch Reaktionen mit 50% geschädigter Zellen aufwiesen. Dies ließ vermuten, daß die Seren auch gegen B- Zellen spezifische Antigene gerichtete Antikörper enthielten.

Zur Absorption wurden Thrombozyten von 50 Rindern der Rassen Deutsches Fleckvieh, Deutsches Braunvieh und Deutsches Schwarzbuntes Rind gesammelt, mit

Stabilisator konserviert und bei 4°C bis zur Absorption aufbewahrt. 70% der Tiere waren männlich.

Von den Isoimmunseren wurde jeweils 1.0 ml Serum mit 0.5 ml Thrombozytensediment absorbiert. Die Absorption wurde mit 0.5 ml Thrombozytensediment des gleichen Pools wiederholt. Nach der Absorption wurden die Thrombozyten durch Ultrazentrifugation aus den Seren entfernt.

Die Isolierung von Thrombozyten aus jeweils 1000 ml stabilisiertem Rinderblut erfolgte durch Zentrifugation 10 Minuten bei 400 g. Die Thrombozytensedimente wurden gesammelt, in dem beschriebenen Blutstabilisator konserviert und bei 4°C bis zur Absorption aufbewahrt.

3.1.3. Zytotoxischer Test

Zum Nachweis von lymphozytären Membranantigenen bzw. Prüfung der Antilymphozytenseren auf zytotoxische Antikörper wurde der mikrozytotoxische Test nach KISSMEYER-NIELSEN und KJERBYE (1967) und THORSBY und KISSMEYER-NIELSEN (1969) eingesetzt.

In Mikrokammern¹, die mit Decköl² gefüllt waren, wurden mit einer Hamilton-Mikroliterspritze ein Mikroliter Serum und ein Mikroliter einer Lymphozytensuspension mit 3.0×10^9 Zellen / 1 einpipettiert. Der Versuchsansatz wurde zur guten Durchmischung von Zellen und Testserum geschüttelt und 30 Minuten bei 27°C inkubiert. Nach Zugabe von einem Mikroliter unverdünntem Kaninchenserum als Komplement, wurde der Versuchsansatz für weitere 30 Minuten bei 27°C inkubiert.

1. Møller Coats, Mikrokammern, Moss (Norway)

2. Biotest- Serum- Institut GmbH, 6 Frankfurt/ Main

Anschließend wurde ein Mikroliter einer 1%igen Trypanblaulösung¹ zugefügt und nach 10 Minuten wurde ein Mikroliter 37%iges Formalin (pH 7.4) zugesetzt. Der Formalinzusatz diente der Fixierung der zytotoxischen Reaktionen. Bei der Ablesung wurde die Anzahl der geschädigten Zellen ermittelt. Die zytotoxische Reaktion ist Komplement abhängig. Die Schrankenfunktion der Lymphozytenmembran wird aufgehoben, die toxisch geschädigten Zellen nehmen Farbstoffe wie Eosin bzw. Trypanblau auf. Die Membran vitaler Zellen ist für diese Farbstoffe undurchlässig.

Zur Beurteilung der Stärke der Reaktion wurde der Prozentsatz der geschädigten Zellen nach folgendem Schema bewertet:

unter		10%	= negativ
10	-	20%	= 1
20	-	30%	= 2
30	-	50%	= 3
50	-	70%	= 4
über		70%	= 5

1. Trypanblau für Mikroskopie 4856; Carl Roth OHG
75 Karlsruhe West

Zur Ausschaltung von Fehlerquellen wurden parallel zu jedem Versuchsansatz serumfreie Kontrollen mit physiologischer NaCl-Lösung mitgeführt. Damit konnten Zellschädigungen, die nicht auf Antikörperreaktionen zurückzuführen waren, erkannt werden. Die Titrationsen wurden auch im mikrozytotoxischen Verfahren durchgeführt.

3.1.4. Trennung von B- und T- Zellen des Rindes

Zur Trennung von B- und T- Zellen wurde der Spontanrosettentest mit Schafererythrozyten und die Trennung in der Nylonwolle angewandt.

3.1.4.1. Rosettierung mit Schafererythrozyten

Zur Typisierung von T- Zellen wurde der Spontanrosettentest nach der Methode von SEILER et al. (1972) modifiziert. Ein Lymphozyten-Erythrozytenverhältnis von 1:32 erwies sich als optimal (FRUCHTMANN et al. 1977).

Die Erythrozyten wurden enzymatisch mit 25 IE Neuraminidase¹/ml vorbehandelt. In zwei Waschgängen wurde die Neuraminidase entfernt, das Erythrozytensediment wurde mit physiologischer NaCl- Lösung auf das Ausgangsvolumen gebracht.

Lymphozyten wurden auf eine Dichte von $5 \times 10^9 / l$ in 0.4 ml physiologischer NaCl-Lösung eingestellt. Anschließend wurden dem Ansatz $160 \times 10^{12} / l$ Erythrozyten in 0.1 ml physiologischer NaCl-Lösung zugesetzt. Dann wurde der Ansatz bei Zimmertemperatur auf einem Rotor (15 U/ Minute) durchmischt und fünf Minuten bei 100 g zentrifugiert. Nach einer Inkubation von dreißig Minuten bei 4°C wurde der Ansatz zur Zählung der Spontanrosetten durch leichtes Schütteln resuspendiert. Die Anzahl der Rosetten wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit Helllinien im abgedunkelten Feld bestimmt. Lymphozyten, die weniger als drei Erythrozyten gebunden hatten und Erythrozytenzusammenballungen, wurden nicht als Rosetten gewertet.

1. Neuraminidase, Behring Werke AG

Die Trennung der rosettierenden T- Zellen und der nicht rosettierenden B- Zellen erfolgte fünfzehn Minuten bei 100 g durch Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser g-Zahl sedimentierten die Spontanrosetten, die B- Zellen befanden sich als weißer Ring im Überstand.

3.1.4.2. Trennung in der Nylonwollensäule

Zur Trennung von T- und B- Zellen in der Nylonwollensäule¹ wurde die Methode von WERNER et al.(1977) modifiziert.

2,0 ml Lymphozytensuspension (35×10^9 / l) wurden in die Nylonwollensäule gefüllt. Im Gegensatz zu WERNER et al.(1977) wurde auf eine Vorbehandlung der Nylonwollensäule mit HCl verzichtet. Die Nylonwollensäule wurde bis zur Marke 5 ml mit dem Spritzenstempel komprimiert und mit 50 ml physiologischer NaCl- Lösung (37°C) gespült.

1. Leuko-Pak^(R) Leucocyte Filter, Fenwal Laboratories Div. Travenol Laboratories Inc, Deerfield ILL. 60015 USA

Beide Enden der Spritze wurden mit Parafilm¹ verschlossen und dreißig Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Parafilmverschlüsse entfernt und mit 2.0 ml Lymphozytensuspension beschickt. Anschließend wurden beide Enden der Spritze wieder mit Parafilm verschlossen. Nach einer weiteren Inkubation von dreißig Minuten bei 37°C wurden die Verschlüsse entfernt, der Konus der Spritze mit einer Injektionsnadel der Größe 21 G versehen. Die Säule wurde dann mit 40.0 ml physiologischer NaCl-Lösung gespült. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1.8 ml / Minute wurden die T- Zellen in Reagenzgläsern aufgefangen.

Zur Isolierung der B- Zellen wurde die Injektionsnadel vom Konus der Spritze entfernt, die Säule mit dem Spritzenstempel komprimiert und erneut mit 40.0 ml physiologischer NaCl- Lösung gespült. Bei einer durch die Entfernung der Injektionsnadel bedingten, erhöhten Durchflußgeschwindigkeit, wurden die B- Zellen isoliert und in Reagenzgläsern aufgefangen.

1. Parafilm^(R), American Can Company Neenah, Wisconsin USA.

Zur Kontrolle der Anreicherung der T- und B- Zellen wurde der Spontanrosettentest eingesetzt. Die isolierten Zellpopulationen wurden zehn Minuten bei 450 g zentrifugiert.

Für die Untersuchung auf lymphozytotoxische Antikörper wurden die in B- und T- Zellen getrennten Lymphozyten sowie die nicht getrennten Lymphozyten auf 3×10^9 Lymphozyten / l eingestellt. Nach der Trennung wurde der Nylonwollefilter aus der Spritze entfernt und verworfen.

4. Ergebnisse

4.1. Absorption der Immunseren mit Thrombozyten

Seren, die von acht verschiedenen Rindern stammten, wurden mit Thrombozyten aus dem gleichen Thrombozyten-Pool absorbiert. 1.0 ml Serum wurde mit 1.07×10^{12} Thrombozyten absorbiert. Der Pool bestand aus Thrombozyten verschiedener deutscher Rinderrassen. 70% der Tiere waren männlich.

Es kann davon ausgegangen werden, daß durch die Absorption alle Antikörper entfernt wurden, die gegen Antigene gerichtet sind, die gemeinschaftlich auf T- und B- Zellen vorhanden sind. Durch den hohen Anteil an Thrombozyten männlicher Tiere im Absorptionsmaterial wurde gleichzeitig gewährleistet, daß eventuell in den Seren vorhandene Antikörper, die gegen H-Y Antigene gerichtet waren (GOULMY et al.1977), eliminiert wurden.

. Zur Kontrolle des Absorptionserfolges wurden sowohl die absorbierten als auch nicht absorbierten Seren gegenüber getrennten und nicht getrennten Lymphozytensuspensionen von vier Rindern titriert.

Der Antikörpertiter der nicht absorbierten Seren gegenüber nicht fraktionierten Lymphozyten betrug 1:8 bis 1:512. Die mit Thrombozyten absorbierten Immunsereen zeigten demgegenüber einen wesentlich niedrigeren Titer von 1:2 bis 1: 64

Der Prozentsatz zytolytisch geschädigter Zellen bei Einsatz absorbierter Seren, lag nicht über 50%. Nach der Trennung der Lymphozyten in T- und B- Zellen, ergab sich bei den B- Zellen eine verstärkte Zytolyse, die einen Prozentsatz von 70% erreichte oder überstieg. Auch die Titer gegenüber B- Zellen lagen um zwei bis drei Verdünnungsstufen höher, als die Titer der nicht getrennten Lymphozyten.

Im Gegensatz dazu waren bei den T-Zellsuspensionen sehr schwache zytolytische Reaktionen (unter 10%) zu beobachten, und die Titer lagen wesentlich unter denen, die gegenüber nicht getrennten Lymphozyten festgestellt wurden.

Es ist damit bewiesen, daß es sich bei den nachgewiesenen Antigenen um B- Zellen spezifische Antigene handelt.

Zwei der Seren enthielten Antikörper, die nur B- Zellen gegenüber zytotoxische Reaktionen zeigten. Diese Immunseren wiesen nach Absorptionen mit Thrombozyten keinen Titerverlust auf. Das kann als weiterer Beweis für die B-Zellen Spezifität dieser Immunseren gewertet werden.

4.2. Trennung von B- und T- Lymphozyten

Die Trennung von B- und T- Lymphozyten wurde auf zwei verschiedenen Wegen versucht, der Spontanrosettierung und der Trennung in der Nylonwollensäule.

4.2.1. Spontanrosettenbildung

T- Zellen aus Lymphknoten und peripherem Blut wurden durch Spontanrosetten markiert. Die Spontanrosettenbildung boviner T- Zellen wurde in dreißig Versuchen geprüft.

Der Prozentsatz der beobachteten Spontanrosetten lag durchschnittlich bei 21%. Der niedrigste Wert betrug 6%, der höchste 44%. Im Gegensatz zu diesen Werten für Blutlymphozyten lag der Prozentsatz der Spontanrosettierung mit Lymphozyten aus Lymphknoten im Durchschnitt bei 32%. Die Grenzwerte betrugen hier 8% und 78%.

Die Fähigkeiten von T- Lymphozyten verschiedener Rinder zur Bildung von Spontanrosetten unterlag damit sehr großen Schwankungen.

Erythrozyten verschiedener Schafe führten zu unterschiedlichen Prozentsätzen an Spontanrosetten mit Lymphozyten eines Rindes. Es handelte sich dabei nicht um Zählungsfehler. Bei wiederholter Rosettierung mit Lymphozyten des gleichen Rindes

und den Erythrozyten der selben Schafe, lag die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei 98%.

Erythrozyten der einzelnen Schafe ergaben mit den Lymphozyten eines Rindes Spontanrosettenwerte, die zwischen 8% und 50% lagen.

4.2.2. Trennung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule

Nach der Trennung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule wurden die angereicherten B- und T- Zellsuspensionen mikroskopisch auf noch verbliebene Thrombozyten untersucht.

T- Zellen angereicherte Suspensionen enthielten vereinzelt Thrombozyten, die in der Nylonwolle nicht hafteten. Diese ließen sich durch Waschvorgänge entfernen. Im Gegensatz zu den T- Zellsuspensionen, waren die B- Zellsuspensionen frei von Thrombozyten.

Zur Kontrolle der Anreicherung von B- und T- Zellen wurde der Spontanrosettentest eingesetzt.

Der mit nicht fraktionierten Lymphozyten erzielte Prozentsatz an Spontanrosetten wurde nach der Trennung mit dem Spontanrosettenprozentsatz in B- und T- Zellsuspensionen verglichen. Auch die angereicherten B- Zellsuspensionen wurden auf Spontanrosetten untersucht. Die Anzahl der Spontanrosetten lag gegenüber den nicht getrennten Lymphozyten beachtlich unter den durchschnittlichen Ausgangswerten.

In der T- Zellenfraktion wurde mindestens eine Verdoppelung der Anzahl an Spontanrosetten beobachtet. Dies diente als Beweis einer Anreicherung, sowohl der B- Zellen als auch der T- Zellen nach der Fraktionierung.

Die Anreicherung von B- und T- Zellen konnte außerdem mit den unterschiedlichen Reaktionsstärken im zytotoxischen Test bewiesen werden. Im Vergleich zu den nicht getrennten Lymphozyten zeigten die angereicherten B- Zellen verstärkte und die angereicherten T- Zellen verminderte Reaktionen.

Für die Familienuntersuchungen wurden die Lymphozyten aller Rinder jeweils als B- und T- Zellen sowie nicht fraktioniert untersucht.

B- Zellen spezifische Antikörper ergaben bei den nicht getrennten Lymphozytenpopulationen eine Reaktionsstärke mit nicht mehr als 50% geschädigter Zellen. Die Anzahl der geschädigten Zellen bei den angereicherten B- Zellen lag wesentlich höher, als in der nicht getrennten Ausgangspopulation. Die zytolytischen Reaktionen bei den angereicherten T- Zellenfraktionen lagen bei weniger als 10% oder fehlten.

Der durchschnittliche Verlust an Lymphozyten bei der Trennung in der Nylonwollensäule betrug 45.4%. Durchschnittlich wurden 41.6% T- Lymphozyten und 13.6% B- Lymphozyten gewonnen. Der große Verlust an B- Zellen ergibt sich aus der Tatsache, daß sich bei schonender Isolierung Zellverluste nicht vermeiden ließen.

4.3. Serologische Markierung von B- Zellen

Die Lymphozyten der dreißig Rinder, die den untersuchten Familien angehörten, wurden zur serologischen Markierung von B- Zellen spezifischen Antigenen in B- und T- Zellen getrennt. Als negative Kontrollen dienten die angereicherten T- Zellen. Als Vergleichskontrolle für die positiven Reaktionen wurden die nicht getrennten Lymphozyten im Testansatz mitgeführt.

Alle Seren, die zur Typisierung von B- Zellen spezifischen Antigenen in den Rinderfamilien eingesetzt waren, wurden in einer geometrischen Verdünnungsreihe bis zu einem Titer von 1:2048 geprüft. Diese Titration diente in erster Linie einer Abgrenzung der B- Zellen spezifischen Reaktionen von starken Zytolysen, die gegen alle Lymphozyten gerichtet sind. Derartige Reaktionen sind dadurch gekennzeichnet, daß alle Lymphozyten zu 100% lysiert werden.

Schwache, nicht B- Zellen spezifische Reaktionen, die eine Zellschädigung von 50% nicht überschreiten, sind im Gegensatz zu den B- Zellen spezifischen Reaktionen daran zu erkennen, daß sie in allen Zellpopulationen den gleichen Prozentsatz geschädigter Lymphozyten zeigen. Dies ist besonders wichtig bei schwachen Merkmalsträgern einerseits und andererseits auch bei schwachtitrigen Antilymphozytenseren.

B- Zellen spezifische Antilymphozytenseren ergaben in fraktionierten und nicht fraktionierten Lymphozytensuspensionen typische Unterschiede im Prozentsatz der geschädigten Zellen. Bei den nicht getrennten Lymphozyten betrug der Anteil zytolytisch geschädigter Zellen 50% oder weniger, unabhängig von der Höhe des Titors.

Zytolysen von 50% in den nicht getrennten Lymphozytensuspensionen waren nicht als schwache Reaktionen zu werten, da diese Reaktionen in gleicher Stärke in mehreren aufeinander folgenden Verdünnungsstufen auftraten.

Da in den nicht getrennten Lymphozytensuspensionen nicht nur B- Zellen sondern auch andere Lymphozyten enthalten sind, die keine B-Zell Marker aufweisen, bezogen sich diese Reaktionen ausschließlich auf den Anteil der B- Zellen in der Suspension.

Im Gegensatz dazu wurden in den angereicherten B- Zellsuspensionen charakteristisch verstärkte Zytolysen, die über 70% lagen beobachtet. In den T- Zellen angereicherten Suspensionen traten zytolytische Reaktionen in geringerem Umfang und wesentlich vermindelter Reaktionsstärke auf. Der Prozentsatz der zytolytisch geschädigten Zellen betrug 10% und weniger. Bei schwachen Merkmalsträgern und gleichzeitigem Einsatz von Antilymphoseren, die einen Titer von 1:4 nicht überschritten, wurden bei nicht fraktionierten Lymphozyten und angereicherten T- Zellsuspensionen, häufig keine zytolytischen Reaktionen festgestellt. Bei den angereicherten B- Zellsuspensionen jedoch, wurden Reaktionen festgestellt, die aber eine Zytolyse von 50% nicht überstiegen.

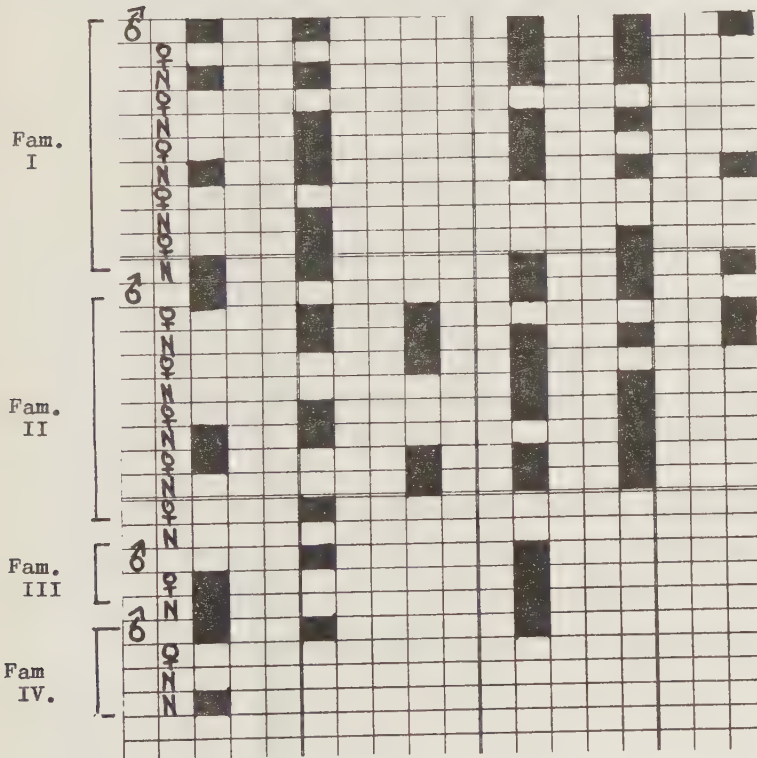
Antilymphozytenserum, die mit nicht fraktionierten Lymphozyten eine scheinbar negative Reaktion ergeben, können B- Zellen spezifische Antikörper enthalten, die nur mit angereicherten B- Zellen reagieren. Die Spezifität der B- Zellen spezifischen Reaktionen wurde durch doppelte Ausführung der Versuchsansätze gesichert.

Bei der Untersuchung von 60 Rindern ergaben sich sechs verschiedene Reaktionsmuster, die an 29 Tieren aus vier verschiedenen Rinderfamilien in Tabelle I dargestellt wurden. Die Reaktionsmuster der B- Zellen spezifischen Antilymphozytenserum unterschieden sich deutlich von den Reaktionsmustern derjenigen Antilymphozytenserum, die nicht mit Thrombozyten oder mit nicht fraktionierten Lymphozyten absorbiert waren. Damit war es möglich, an den Lymphozyten der untersuchten Rinder B- Zellen spezifische Antigene zu markieren, die an anderen kernhaltigen Zellen nicht vorhanden sind.

Tabelle I

Darstellung der sechs B- Zellen spezifischen Antigen-
muster, Mü-B-1 - Mü-B-6

ALS : 5201 5209 5211 5222 5228 5205
B-Z.Sp. B-1 B-2 B-3 B-4 B-5 B-6



ALS = Antilymphozytenserum
B-Z.Sp= B- Zellen Spezifität
N = Nachkomme

♂ = Vattertier
♀ = Muttertier

Die Auswahl der zur Untersuchung eingesetzten Seren erwies sich als richtig, da acht der neun geprüften Seren Antikörper enthielten, die gegen B- Zellen spezifische Antigene gerichtet waren.

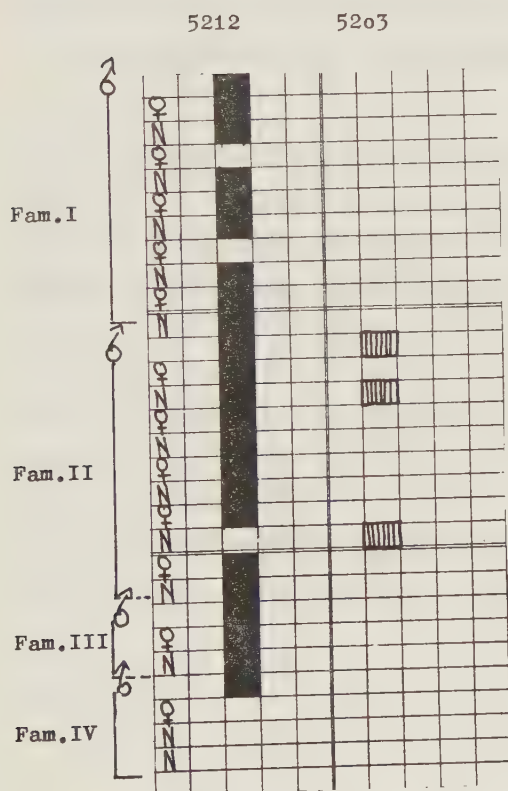
Bei der Analyse der serologischen Reaktionen ergaben sich sechs verschiedene Antigenmuster, die untereinander offensichtlich keine Beziehungen aufwiesen. Als vorläufige Bezeichnung für die unterschiedlichen Antigene wurden die Bezeichnungen Mü-B-1 bis Mü B-6 gewählt (Tabelle I).

Die übrigen Antilymphozytenserum 5203, 5212 und 5217 erfaßten Merkmalsträger von B- Zellen spezifischen Antigenen, die jedoch im Augenblick noch nicht sicher eingeordnet werden konnten.

Das Serum 5212 enthält mit großer Wahrscheinlichkeit Antikörper zum Nachweis mehrerer B- Zellen spezifischer Antigene. Es handelt sich demnach um ein polyvalentes Antilymphozytenserum(Tabelle II).

Tabelle II

Reaktionsmuster des polyvalenten Antilymphozy-
tenserum 5212 und des Antilymphozytenserum 5203
bei vier verschiedenen Rinderfamilien



Das Serum 5203 zeigte nur drei schwache Reaktionen bei den Tieren einer einzigen Fleckviehfamilie. Bei den Cholmogoren-Rindern wurde mit diesem Serum eine größere Anzahl von Merkmalsträgern erfaßt. Da aber bei dieser Rasse nur Mutter-Tochterpaare zur Typisierung zur Verfügung standen, konnte aufgrund der nicht untersuchten Väter der Erbgang dieser Lymphozytenantigene nicht zur Sicherung einer Zuordnung herangezogen werden.

Das Immunserum 5217 stammte vom selben Tier wie das Serum 5211. Die Blutentnahme zur Serumgewinnung 5211, erfolgte am 43. Tag nach der Hauttransplantation. Das Serum 5217 wurde am 59. Tag nach der Hauttransplantation gewonnen.

Die nicht mit Thrombozyten absorbierten Seren wurden gegenüber nicht fraktionierten Lymphozyten des Hautspenders titriert. In beiden Fällen betrugen die Titer 1:32. Nach Absorption beider Seren mit Thrombozyten wurden unterschiedliche Antikörpertiter festgestellt.

Zwischen dem 43. und 59. Tag nach der Hauttransplantation fiel der Titer der B- Zellen spezifischen Antikörper ab. Der Titerabfall war der Grund dafür, daß mit dem Serum 5217 nicht alle Merkmalsträger der Spezifität Mü B-3 erfaßt wurden.

4.4. Familienuntersuchungen zum Nachweis der Vererbung von B- Zellen spezifischen Antigenen.

Die genetische Analyse der einzelnen Reaktionsmuster wurde durch den Einsatz von vier verschiedenen, vollständigen Rinderfamilien, deren Abstammung blutgruppenserologisch gesichert war, ermöglicht. Die Untersuchung dieser in Tabelle I aufgeführten Familien hat ergeben, daß die serogenetisch nachgewiesenen B- Zellen spezifischen Antigene einem autosomalen und kodominanten Erbgang folgen (Tabelle I). Aus den Familienuntersuchungen geht außerdem hervor, daß die B- Zellen spezifischen Antigene von zwei Loci kontrolliert sind.

5. Diskussion

5.1. Besprechung der technischen Methoden

Zur Lymphozytentypisierung können Lymphozyten aus peripherem Blut und aus Lymphknoten isolierte Lymphozyten (OTTO und SCHMID 1970) verwendet werden. Die Isolierung von Lymphozyten aus stabilisiertem, peripheren Rinderblut ist dadurch erschwert, daß die Thrombozyten oft erst nach mehreren Waschgängen entfernt werden konnten.

Die Anzahl der geschädigten Lymphozyten lag regelmäßig unter 5%. Bovine Lymphozyten, die aus Lymphknoten isoliert wurden, zeigten in der Regel einen viel höheren Prozentsatz an geschädigten Zellen, der um 30% lag. Deshalb eignen sich aus Lymphknoten gewonnene Lymphozyten des Rindes nicht zur Typisierung. Im Gegensatz dazu können aus Lymphknoten isolierte Schweinelymphozyten zur Typisierung verwendet werden, da der Anteil an geschädigten Zellen regelmäßig unter 2% lag.

Da bovine Lymphozyten während der Aufbereitung sehr leicht mechanisch geschädigt werden können, wurde versucht, die Lymphozytenmembran mit Jodacetamid zu härten (HASEGAWA et al. 1973). Dabei ergaben sich keine entscheidenden Vorteile gegenüber nicht behandelten Lymphozyten. Bei einem schonendem Isolierungsverfahren und einer Untersuchung, die innerhalb von vier bis fünf Stunden nach der Blutentnahme abgeschlossen war, konnten zuverlässige und wiederholbare Ergebnisse erzielt werden.

Die Trennung von Lymphozyten in B- und T- Zellen brachte technische Schwierigkeiten mit sich. In vorliegender Arbeit wurden zwei Methoden zur Trennung von B- und T- Lymphozyten eingesetzt. Es handelte sich um die Spontanrosettenbildung mit Schafer erythrozyten und die Trennung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule.

GREWAL et al. (1976) und FRUCHTMANN et al. (1977) wiesen darauf hin, daß bovine T- Zellen mit Schafer erythrozyten in vitro Spontanrosetten bilden. Nach eigenen Beobachtungen lagen die Prozentsätze für die Spontanrosetten zwischen 6% und 44%.

Andererseits ergaben sich große Unterschiede in der Spontanrosettenbildung der Lymphozyten eines Rindes mit Erythrozyten verschiedener Schafe. Die unterschiedliche Bindungskapazität der Erythrozyten verschiedener Schafe war unabhängig von ihren erythrozytären Blutgruppen. Ähnliche Beobachtungen machte auch FINK (1977) mit menschlichen Lymphozyten.

Die in der Literatur angegebenen unterschiedlichen Rosettierungsprozentsätze sind möglicherweise darauf zurückzuführen, daß mit Erythrozyten unterschiedlicher Schafe gearbeitet wurde. Eine weitere Erklärung besteht darin, daß nur bestimmte Reifestadien boviner T- Lymphozyten mit Schafererythrozyten Spontanrosetten bilden (FRUCHTMANN et al. 1977).

Bei der Trennung von Lymphozyten in der Nylonwollensäule stellte sich heraus, daß die Ausbeute an T- Zellen mit durchschnittlich 41.6% wesentlich höher lag, als der Prozentsatz der

markierten T- Lymphozyten im Spontanrosetten-
test mit durchschnittlich 21.6%.

In vorliegender Arbeit wurde die Methode zur
Trennung von Lymphozyten in der Nylonwolle-
säule angewandt, da diese Methode ein einfaches
und schnelles Verfahren darstellt. Bei der Tren-
nung in der Nylonwollensäule stellte sich heraus,
daß zu einem optimalen Trennungserfolg ein be-
stimmtes Verhältnis zwischen Zellzahl und der
Menge der angewandten Nylonwolle erforderlich
ist. Die besten Ergebnisse ließen sich mit dieser
Methode dann erzielen, wenn eine 10 ml Plastik-
spritze mit 0.5 g Nylonwolle gefüllt wurde und
die Gesamtzahl der zu trennenden Lymphozyten
 60×10^6 betrug. Die maximale Belastung des Fil-
ters bei Verwendung von 0.5 g Nylonwolle lag bei
 100×10^6 Lymphozyten. Bei einer noch höheren
Zellzahl war eine Trennung nicht mehr gewähr-
leistet. Es wurde beobachtet, daß bei Anwendung
einer Zellzahl unter 20×10^6 Lymphozyten ein
erheblicher Verlust an Zellen eintrat.

Während der Ausschwemmung der T- Lymphozyten aus der Nylonwolle wurde besonders darauf geachtet, daß die Spritze während dieses Vorganges immer mit physiologischer NaCl- Lösung gefüllt war. Dadurch wurde die Bildung von Luftblasen vermieden, die den Ausschwemmungsvorgang stören.

Die in der Nylonwolle haftenden B- Zellen wurden durch vorsichtige Kompression der Nylonwolle mit dem Spritzenstempel herausgelöst. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Nylonwollefilter nicht zu stark und nicht zu schnell komprimiert wurde, da dadurch eine Schädigung der Membranen der B- Zellen eintreten konnte. Beide Methoden zur Trennung von B- und T- Lymphozyten wiesen Vor- und Nachteile auf.

Der Vorteil der Trennung von Lymphozyten in der Nylonwollensäule lag darin, daß die Zellen in relativ kurzer Zeit mit einer hohen Ausbeute an T- Zellen getrennt werden konnten.

Der Nachteil dieser Methode bestand darin, daß die haftenden B- Lymphozyten bei der Ausspülung aus dem Filter mechanisch geschädigt werden können.

Die Methode der Spontanrosettierung zur Trennung von B- und T- Zellen ist zeitaufwendiger und ergibt eine geringere Ausbeute an T- Zellen. Bei der Anwendung dieser Methode werden die B- Zellen geringeren mechanischen Belastungen ausgesetzt.

Demnach kann für die Isolierung der B- Zellen die Trennung durch Spontanrosettierung und für die Isolierung von T- Zellen die Trennung in der Nylonwollesäule empfohlen werden.

5.2. Besprechung der Ergebnisse

Über Lymphozytenantigene beim Rind berichteten SCHMID und OTTO (1970), SCHMID und CWIK (1972), SCHMID und CWIK (1973) und CALDWELL et al.(1976).

Bei diesen Antigenen handelt es sich um Lymphozytenantigene, die an der Membran aller kernhaltigen Zellen serologisch nachweisbar sind.

BOROWSKA und DEMANT (1967) sowie OSTRAND-ROSENBERG und STORMONT (1974) haben darauf hingewiesen, daß Lymphozyten und Erythrozyten verschiedene Antigene tragen. Eine Sonderstellung nimmt das J- Blutgruppensystem des Rindes ein. Das J- Antigen ist sowohl an Erythrozyten als auch an Lymphozyten und Thrombozyten serologisch nachweisbar (EYQUEM et al. 1956, HRUBAN und SIMON 1973 und RENSMEYER 1977).

Bisher wurden beim Rind nicht getrennte B- und T- Lymphozyten zur Typisierung von Lymphozytenantigenen verwendet. In den letzten Jahren hat man sich vermehrt mit der Erforschung der B- Zellen spezifischen und T- Zellen spezifischen Antigene bei Mensch und Tier befaßt. Es wurde beobachtet, daß beim Menschen einige B- Zellen spezifische Antigene mit HLA-D Determinanten Ähnlichkeiten aufwiesen, was zu der Vermutung führte, daß die HLA-D Determinanten selbst oder ähnliche,

eng verwandte Strukturen serologisch auf B- Zellen markierbar sind (VAN ROOD et al. 1977). Man geht heute davon aus, daß B- Lymphozyten vorwiegend Träger von Ia (Immune associated) Antigenen sind(ALBERT et al.1977 und SHEVACH und SCHWARTZ 1977). Diese Ia- Antigene werden genetisch von den Ir (Immune response) Genen kontrolliert. Die Ir- Gene sind für die Immunantwort verantwortlich und sind demnach für die Markierung einer Resistenz gegenüber von Krankheiten von größter Bedeutung (BERTRAMS 1976,ALBERT et al. 1977, GRUMET 1977 und NIJENHUIS 1977).

Ia-Antigene wurden bei Maus (HÄMMERLING 1976), Meerschweinchen(SHEVACH und SCHWARTZ 1977), Kaninchen (CRESSWELL und GEIER 1975), Schwein (VAIMAN et al. 1975), Hund (GOLDMANN et al. 1975) und Rhesusaffe (BALNERⁱ et al. 1976) nachgewiesen.

Der Nachweis von HLA-D Antigenen beim Menschen und den diesen entsprechenden Antigenen beim Tier wurde im MLC (Mixed Lymphocyte Culture) Test erbracht. Die im MLC-Test erfaßten Antigene wurden zunächst als LD (Lymphocyte defined) Antigene bezeichnet, im Gegensatz zu den SD(Serological defined) Antigenen.

VAN ROOD et al. (1975) hatten eine Methode zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen beim Menschen entwickelt und gezeigt, daß sich der HLA-D Locus neben dem MLC- Test auch durch eine serologische Typisierung erfassen läßt. Auch T- Zellen spezifische Antigene wurden inzwischen serologisch markiert (ALBERT et al.1977).

Im MLC- Test wiesen USINGER et al.(1977) beim Rind LD- Antigene nach, die ihrer Auffassung nach dem MHC (Major-Histocompatibility-Complex) des Rindes zugeordnet werden müssen. Ihre Ergebnisse sprachen dafür, daß die LD- Antigene von mindestens zwei Loci kontrolliert werden.

In vorliegender Arbeit wurden B- Zellen spezifische Antigene markiert und Hinweise dafür erbracht, daß diese Antigene beim Rind von mindestens zwei Loci genetisch kontrolliert werden.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die eingesetzten Isoimmunseren, die nach Hauttransplantationen gewonnen wurden, Antikörper enthielten, die dem MHC des Rindes angehören. Nach Fraktionierung der Antilymphozytenseren durch Absorption, standen Testseren zur Verfügung, die B-Zellen spezifische Antigene markierten. Dieser Nachweis war erst möglich, nachdem es gelungen war, B- und T- Zellen anzureichern und zu typisieren.

Antilymphozytenseren, die gegen B- Zellen spezifische Antigene gerichtet sind, zeigen charakteristisch schwache Reaktionen ähnlich wie beim Menschen mit 10-25% zytolytisch geschädigter Zellen (VAN ROOD et al.1975 und ALBERT et al.1977).

Dies kann ein erster Hinweis darauf sein, daß ein Antilymphozytenserum B- Zellen spezifische Antigene markiert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um Reaktionen handelt, die gegen Antigene aller kernhaltigen Zellen gerichtet sind und nur schwache Merkmalsträger erfassen.

Beim Einsatz angereicherter B- und T-Zellpopulationen lassen sich B- Zellen spezifische Reaktionen dadurch erkennen, daß die angereicherten T- Zellen keine Reaktionen aufweisen. Bei schwachen Merkmalsträgern für nicht B- Zellen spezifische Antigene, treten gleichmäßige schwache Reaktionen in allen Zellpopulationen auf.

Die neun eingesetzten Antilymphozytenserum wurden in getrennten Verfahren einerseits für vorliegende Arbeit mit Thrombozyten absorbiert, andererseits für eine parallel laufende Arbeit(VOLLMER1979) mit Lymphozyten absorbiert.

Alle nicht absorbierten und absorbierten Seren wurden gegenüber nicht fraktionierten sowie angereicherten B- und T-Zellen der Fleckviehrinderfamilien und den Rindern der Chalmogorenrasse geprüft. Dieser Vergleichstest diente dem Ziel, B-Zellen spezifische Antigene von Antigenen, die an allen kernhaltigen Zellen vorhanden sind, zu differenzieren. Es war anzunehmen, daß in den Antilymphozytenserum sowohl gegen B-Zellen spezifische Antigene gerichtete Antikörper als auch Antikörper, die gegen Antigene aller Lymphozyten gerichtet waren, vorhanden waren. Diese Annahme bestätigte sich durch die unterschiedlichen Absorptionsergebnisse.

Antikörper, die nicht gegen B-Zellen spezifische Antigene gerichtet waren, wurden durch Absorption mit Thrombozyten entfernt. Der Vergleich der B-Zellen spezifischen Reaktionsmuster mit den Reaktionsmustern der mit Lymphozyten absorbierten Seren zeigte, daß mit diesen Seren unterschiedliche und voneinander unabhängige Antigene markiert wurden. Als Beispiel für zwei unterschiedliche Spezifitäten, die innerhalb eines Immunserums nachgewiesen wurden, dient das Antilymphozytenserum 5211 (Tabelle III).

Tabelle III

Darstellung zweier unterschiedlicher Spezifitäten
innerhalb des Antilymphozytenserums 5211
bei der Cholmogorenherde

5211

I	II
■	
■	
■	
	■
■	
■	■
■	
■	
	■
■	■

I = B- Zellen spezifisches Reaktions-
muster

Bei dem Muster I handelte es sich um B- Zellen spezifische Antigene, bei dem Muster II um Antigene, die an allen Lymphozyten vorhanden sind. Es fiel auf, daß die Häufigkeit der Reaktionen mit den Seren 5211 (I + II) und 5217(I +II) bei den Cholmogorenrindern größer war, als bei den untersuchten Fleckviehrindern. Die nicht B- Zellen spezifischen Reaktionen des Serums 5211(II)(TabelleIII) traten nur bei einem von 55 Flechviehrindern auf. Bei den Cholmogorenrindern waren es vier Merkmalsträger unter 29 Tieren.

Im Gegensatz dazu traten Merkmalsträger für das B- Zellen spezifische Antigen Mü-B 3(5211 I)(TabelleIII) häufiger auf. Nach Hauttransplantationen wurden demnach sowohl Antikörper gegen B- Zellen spezifische Antigene als auch gegen Antigene, die an allen Lymphozyten vorkommen, gebildet. Daraus ergibt sich die Bedeutung der B- Zellen spezifischen Antigene für die Gewebeverträglichkeit auch beim Rind.

Die Antilymphozytenserum 5211 und 5217 stammten von dem gleichen Tier. Die Blutentnahme zur Serumgewinnung erfolgte für das Serum 5211 am 43. Tag und für das Serum 5217 am 59. Tag nach der Hauttransplantation. Bei der Überprüfung beider Seren gegenüber den Lymphozyten des Transplantat-spenders ergab sich in beiden Seren ein zytotoxischer Titer von 1:32. Bei den in diesen Seren vorhandenen B- Zellen spezifischen Antikörpern ergab sich bei dem am 59. Tag gewonnenen Isoimmunserum ein Titerabfall, so daß die schwachen Merkmalsträger für dieses Antigen nicht mehr erfaßt wurden.

Bei der Analyse der Immunseren auf B- Zellen Spezifitäten erfaßten die Reaktionsmuster bestimmte Antigene, die als Mü B-1 bis Mü-B-6 bezeichnet wurden. Bei anderen Seren bestand aufgrund der Häufigkeit (Tabelle II, Serum 5212) oder aber der Seltenheit der positiven zytolytischen Reaktionen (Serum 5203) keine Möglichkeit einer der-

artigen endgültigen Zuordnung. Diese Seren wurden mit den vorläufigen Nummern 5203 und 5212 bezeichnet.

Die Differenzierung der B- Zellen spezifischen Antigene Mü B-1 bis Mü B-6 erfolgte durch serogenetische Untersuchung. Da es im Augenblick noch nicht möglich ist, die B- Zellen spezifischen Antigene bestimmten Genorten zuzuordnen und außerdem eine internationale Nomenklatur noch fehlt, wurden diese Antigene mit der Bezeichnung Mü-B-1 bis Mü-B-6 versehen. B- bedeutet B- Zellen Spezifität (Tabelle I).

In Tabelle II wurden die mit Thrombozyten absorbierten Immunseren dargestellt, die in ihren Reaktionsmustern nicht zu den Antigenen Mü-B-1 bis Mü-B-6 zuzuordnen waren.

Mit dem Serum 5203 konnten nur drei Merkmalsträger erfaßt werden. Da es sich um ein B- Zellen spezifisches Serum mit einem Titer von 1:2 handelte, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß dieses Antilymphozytenserum nicht alle, sondern nur starke Merkmalsträger erfaßt.

Andererseits handelte es sich bei den positiven Merkmalsträgern um ein Vatertier mit zwei Nachkommen, bei negativer Mutter. Demnach müssen die Nachkommen für dieses Antigen heterozygot und schwache Merkmalsträger sein. Da in den zur Verfügung stehenden Familien nicht geprüft werden konnte, ob das Reaktionsmuster ein selbständiges Antigen markiert, oder aber als Teil des Antigens Mü-B-4 oder Mü-B-5 anzusehen war, wurde auf eine Bezeichnung als B- Zellen Antigen verzichtet.

Das Antilymphozytenserum 5205 zeigte ein Reaktionsmuster, das theoretisch in das Reaktionsmuster Mü-B-2 integriert werden konnte und den Anschein erweckte, nur starke Merkmalsträger zu erfassen.

Bei der Titration gegenüber von Lymphozyten von fünf Merkmalsträgern aus zwei Fleckviehfamilien und fünf Merkmalsträgern der Chalmogorenrinder stellte sich heraus, daß die Titer eine Konstanz von 1:32 aufwiesen. Damit konnte davon ausgegangen werden, daß es sich um eine selbständige Serospezifität handelt, die sowohl schwache als auch starke Merkmalsträger erfaßt. Diese B- Zellspezifität wurde mit Mü-B-6 bezeichnet.

6. Zusammenfassung

Bei der Differenzierung des bovinen Histokompatibilitätskomplexes(BOLA) gelang es, ähnlich wie beim Menschen, nun auch beim Rind Antigene zu markieren, die für B- Lymphozyten spezifisch sind.

Eine Anreicherung von B- Lymphozyten schaffte die technische Voraussetzung für diese Untersuchungen. Die Trennung in B- und T- Lymphozyten erfolgte in der Nylonwolle-Säule.

Zur serologischen Untersuchung wurden sowohl nicht getrennte als auch angereicherte B- und T- Lymphozyten eingesetzt. Die T- Zellpopulationen dienten als negative Kontrolle.

Die zum Nachweis von B- Zellen spezifischen Antigenen eingesetzten Antilymphozytenserum wurden durch Hauttransplantationen beim Rind gewonnen. Die zur Untersuchung ausgewählten neun Isoimmunserum wurden zunächst mit Thrombozyten absorbiert, um die Antikörper zu entfernen, die gegen alle kernhaltigen Zellen gerichtet waren.

Da die B- Zellen spezifischen Antigene nicht an Thrombozyten vorhanden sind, enthielten die absorbierten Seren ausschließlich gegen B- Zellen gerichtete Antikörper.

Der serologische Mikrolymphozytotoxizitätstest wurde zum Nachweis und der Typisierung von B-Zellen spezifischen Antigenen des Rindes eingeführt.

Mit den absorbierten Immunseren gelang es, sechs verschiedene für B- Lymphozyten spezifische Antigene zu markieren. Diese Antigene wurden vorläufig als Mü-B 1- Mü-B 6 bezeichnet.

Bei der Untersuchung von Rinderfamilien ergab sich, daß diese B- Zellen spezifischen Antigene einem autosomalen und kodominanten Erbgang folgen. Da Anhaltspunkte dafür bestehen, daß die B- Zellen spezifischen Antigene den durch Ir- Gene kontrollierten Ia- ähnlichen Antigenen entsprechen, wurden mit den vorgelegten Ergebnissen Voraussetzungen geschaffen, um Merkmale serologisch zu erfassen, die für die Resistenzforschung von großer Bedeutung sind.

7. Summary

In the study of the bovine histocompatibility complex (BOLA) the identification of B-lymphocyte-specific antigens in cattle was achieved.

B- and T- lymphocytes were separated in the nylon- wool- column yielding enriched B- and T-cell populations required for this study.

Unseparated lymphocyte suspensions as well as enriched B- and T- cell suspensions were simultaneously employed for the serological typing. The T- cell suspensions were utilised as negative controls.

Anti-lymphocyte reagents used for the detection of B-lymphocyte-specific antigens were obtained after skin grafting in cattle. The nine selected iso-immune reagents were absorbed with thrombocytes to eliminate first antibodies directed against antigens present on all nucleated cells.

Since B- cell- specific antigens are not known to be present on platelets, such absorbed reagents contained antibodies directed against B- lymphocytes only. The serological micro-lymphocytotoxic test was introduced for the typing of B- cell- specific antigens in cattle.

The employed isoimmune reagents allowed to identify six different B- cell- specific antigens. These antigens were preliminary designated as Mü-B 1 -Mü-B6. Family studies confirmed that these antigens are genetically determined, and follow the autosomal and codominant mode of inheritance.

Since it is generally accepted that B-cell-specific antigens are equivalents of the Ia-antigens, or, Ia- like antigens, and controlled by the Ir-genes, this study opens up a possibility to mark serologically structures which are of great importance in resistance research.

.

8. Literaturverzeichnis:

Albert, E.D., A. Andreas, A. McNichols, S. Scholtz und
B. Kuntz (1977):

B- and T-cell-specific alloantigens in
man.

Scand. J. Immunol. 6, 427-430

Albert, E.D., Amos, D.B., Bodmer, W.F., Ceppellini, B.,
Dausset, J., Kissmeyer-Nielsen, F., Payne, R.,
van Rood, J.J., Terasaki, P.I., Trnka, Z.,
Walford, R.L. (1978):
Nomenclature for factors of the HLA-System,
1977.

Bull. W.H.O. 56, 461-465

Bach, F.H., und K. Hirschhorn (1964):

Lymphocyte interaction: A potential histo-
compatibility test in vitro.

Science 143, 813-814

Bain, B., M.R. Vas und L. Lowenstein (1963):

A reaction between leucocytes in mixed
peripheral blood cultures.

Fed. Proc. 22, 428

Balner, H., W. van Vreeswijk und J.H. Roger (1976):

Ia-like antigens of rhesus monkeys:
current state of serology and genetics.

Transplant. Rev. 30, 3-17

Bertrams, J. (1976):

HLA- Antigene und Krankheitsempfäng-
lichkeit.

Dtsch. med. Wschr. 101, 178-184

Borowska, M., und P. Demant (1967):

Specificity of cytotoxic antibodies
in typing sera against cattle blood
groups antigens.

Fol. biol. 13, 473-475

Bowles, C.A., G.S. White und D. Lucas (1975):

Rosette formation by canine peripheral
blood lymphocytes.

J. Immun. 114, 399-402

Caldwell, J., C. Bryan, D.F. Weseli (1976):

Analysis of cattle histocompatibility
antigens.

XV. Int. Conf. Animal Blood Grps. and
biochem. Polymorphism, Dublin 1976

Cresswell, P., S.S. Geier (1975):

Antisera to human B- lymphocyte membrane
glycoproteins block stimulation in mixed
lymphocyte culture.

Nature 257, 147-149

Dausset, J. (1954):

Presence des antigenes A et B dans les
leucocytes decelée par des épreuves
d agglutination.

C.R. Soc. Biol. (Paris) 148, 1607-1608

Eisen, S.A., H.J. Wedner und C.W. Parker (1972):

Isolation of pure human peripheral blood
T-lymphocytes using nylon wool columns.
Immunol. Commun. 1, 571-577

Escajadillo, C., R.M. Binns (1975):

Rosette formation with sheep erythrocytes:
a possible T-cell marker in the pig.
Int. Archs. Allergy appl. Immun. 48, 261-275

Eyquem, A., L. Podliachouk, B. Maupin (1956):

Les antigenes heterophiles J, R et A
des plaquettes et leucocytes humains.
Ann. Inst. Pasteur 91, 598-602

Fink, U. (1977):

Persönliche Mitteilung
Hämatologisches Forschungslabor der
I. Med. Klinik re. d. Isar d. Techn. Univ.
München

Fruchtmann, R., G. Uhlenbruck, D. O. Schmid und S. Cwik (1977):

Zur Charakterisierung von T- und B- Lymphozyten beim Rind.

Zbl. Vet. Med. B. 24, 486-496

Goldmann, S. F., K. Krumbacher, H. Schnappauf, H. D. Flad (1975):

Definition of MLC specificities in the dog.

Transplant. Proc. 7, 389-393

Goulmy, E., B. A. Bradley, A. van Leeuwen, Q. Lansbergen,

A. Munro, A. Termijtelen und J. J. van Rood (1977):

The immunogenicity in women of male cells bearing H-Y and HLA-A2.

Tissue Antigens 10, 248

Greaves, M. F., und G. Brown (1974):

Purification of human T and B lymphocytes.

J. Immunol. 112, 420-423

Green, I. (1974):

Genetic control of immune responses.

J. Immunogenetics 1, 4-21

Grewal, A.S., B.T. Rouse und L.A. Babiuk (1976):

Erythrocyte rosettes- a marker for
bovine T-cells.

Canad. J. Comp. Med. 40, 298-305

Grumet, F.C. (1977):

HLA and disease associations.

Transplant. Proc. 9, 1839-1844

Gürtler, L.G. und H. Cleve (1978):

Ulex europeus lectin - a lymphocyte
surface label for human B- cells.

Proc. 25th Colloquium Protides of the
biological Fluids.

B. 4, 715-723

Hammarström, S., U. Hellström, P. Perlmann und

M. L. Dillner (1973):

A new surface marker on T lymphocytes of human peripheral blood.

J. exp. Med. 138, 1270-1275

Hämmerling, G. J. (1976):

Tissue distribution of Ia antigens and their expression on lymphocyte subpopulations.

Transplant. Rev. 30, 64-82

Hasegawa, T., Graw, R. G. und P. I. Terasaki (1973):

A microgranulocyte cytotoxicity test.

Transplantation, Vol. 15, 5 492-495

Hruban, V. und M. Simon (1973):

Lymphocytotoxic antibodies against cattle J-antigen.

Anim. Blood Grps. Biochem. Genet. 4, 183-184

Julius, M.H., E. Simpson und L.A. Herzenberg (1973):

A rapid method for the isolation of
functional thymus- derived murine
lymphocytes.

Eur. J. Immunol. 3, 645-649

Kissmeyer-Nielsen, F., K.E. Kjerbye (1967):

Lymphocytotoxic micro-technique.
Purification of lymphocytes by
flotation.

In: Histocompatibility Testing,
381-383, Munksgaard, Copenhagen.

Klein, I. (1974):

The present concept of the major
histocompatibility locus.

6. Tagung der Gesellschaft für Immuno-
logie, Hannover, 23.-25.9.1974

Knapp, W. (1977):

Charakterisierung der Lymphozyten-
Subpopulationen des Menschen.

Dtsch. med. Wschr. 102, 802-806

Mitscherlich, E. (1977):

Grundlagen der Immunitätsbildung und
der Immunprophylaxe beim neugeborenen
Kalb.

Tierärztl. Prax. 5, 45-57

Muscoplat, C.C., D.W. Johnson, K.A. Pomeroy, J.M.

Olson, V.L. Larson, J.B. Stevens und
K.D. Sorensen (1974):

B- and T-lymphocytes in three types
of bovine lymphosarcoma.

Amer. J. Vet. Res. 35, 593-595

Nijenhuis, L.E. (1977):

Genetic considerations on association
between HLA and disease.

Hum. Genet. 38(2), 175-182

Ostrand-Rosenberg und Stormont (1974):

Bovine leucocyte antigens.

Animal Blood Grps. biochem. Genet.

5, 231-237

Otto, F. und D.O. Schmid (1970):

Lymphozytenisolierung aus dem Blut des
Menschen und der Tiere.

Blut 21, 118-122

Reeves, J.H., H.W. Renshaw (1978):

Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes.

Amer. J. Vet. Res. 39, 917-923

Reisner, Y., A. Ravid und N. Sharon (1976):

Use of sojabean agglutinin for the separation of mouse B and T lymphocytes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1585

Rensmeyer, W. (1977):

Beiträge zur vergleichenden Blutgruppenserologie bei Schaf, Rind, Schwein und Mensch mit besonderer Berücksichtigung der Lymphozyten.

Inaugural-Dissertation, Fachbereich Tiermedizin der Universität München.

Richiardi, P., P. Diotallevi, T. Matejc, A.O. Car-

bonara und E.S. Curtoni (1977):

HLA antibodies cytotoxic only for
B-lymphocytes.

Tissue Antigens 10, 323-329

van Rood, J.J., van Leeuwen, A., Keuning, J.J., und

Blusse van Oud Alblas (1975):

The serological recognition of the
human MLC determinants using a modi-
fied cytotoxicity technique.

Tissue Antigens 5, 73-79

van Rood, J.J., A. van Leeuwen, J.J. Keuning und

A. Termijtelen (1977):

Evidence for two series of B-cell
antigens in man and their comparison
with HLA-D.

Scand. J. Immunol. 6, 373-384

Rouse, B.T. und L.A. Babiuk (1974):

Host defense mechanisms against in-
fectious bovine rhinotracheitis virus,
Isolation and immunological activities
of bovine T-lymphocytes.

J. Immunol. 115, 1391-1398

Rouse, B.T. und L.A. Babiuk (1977):

The direct antiviral cytotoxicity by bovine lymphocytes is not restricted by genetic incompatibility of lymphocytes and target cells.

J. Immunol. 118, 618-624

Schmid, D.O. und F. Otto (1970):

Contribution to serology of lymphocytes in cattle and pigs.

XII. Europ. Conference, Anim. Blood Grps. biochem. Polymorph. Budapest, 6.-11.7.1970

Schmid, D.O. und S. Cwik (1972):

On leucocyte serology in pig and cattle.
13th Europ. Conf. Anim. Blood Grps.
26.6.-1.7.1972. Wien

Schmid, D.O. und S. Cwik (1973):

Über den Nachweis von Phaseolus-vulgaris-Rezeptoren bei Lymphozyten und Granulozyten von Rind und Schwein.
Zbl. Vet. Med. B 20, 169-172

Seiler, F.R., H.H. Sedlacek, E.J. Kanzy und W.Lang (1972):

Über die Brauchbarkeit immunologischer
Nachweismethoden zur Differenzierung
funktionell verschiedener Lymphozyten:
Spontanrosetten, Komplementrezeptor-
Rosetten und Immunglobulinrezeptoren.
Behring Institut Mitteilungen 52, 26-72

Shevach, E.M. und B. D. Schwartz (1977):

Overview of the structure and function
of the major histocompatibility complex
of the guinea pig.
Fed. Proc. 36, 9, 2260-2263

Takashima, I., C. Olson, D. M. Driscoll und L.E. Baum-
gartener (1977):

B-Lymphocytes and T- Lymphocytes in
three types of bovine lymphosarcoma.
J. Natl. Cancer Inst. 59, 1205-1209

Thorsby, E., F. Kissmeyer- Nielsen (1969):

HLA- antigens and genes. Production of
HLA typing antisera of desired specificity.
Vox. Sang. 17, 102-111

Uhlenbruck, G., P. Wernet und K. Schuhmacher (1973):

Specific T- cell marking by Helix pomatia
agglutinin after neuraminidase treatment.
Klin. Wschr. 51, 1210-1211

Usinger, W.R., M. Curie- Cohen und W.H.Stone (1977):

Lymphocyte defined loci in cattle.
Science 196, 1017-1018

Vaiman, M., C. Renard, M. Ponceau, J. Lecointre und
P.A. Villiers (1975):

Alloantigenes sous la dependance de la
region SL-A controlant la reaction lympho-
cytaire mixte chez le porc.
C.R. Acad.Sc. Paris, 280, 2809-2812

Vollmer, T. (1979):

Über Lymphozytenantigene beim Rind.

Inaugural- Dissertation. Fachbereich Tier-
medizin der Universität München.

Weiland, F. und O.C. Straub (1975):

Frequency of surface immunoglobulin bea-
ring blood lymphocytes in cattle affected
with bovine leukosis.

Research in Veterinary Science 19, 100-102

Werner, C.H., P.T. Klouda, M.C. Correa, P. Vassalli
und M. Jeannet (1977):

Isolation of B and T lymphocytes by nylon
fiber columns.

Tissue Antigens 9, 227-229

Wigzell, H., K.G. Sundquist und T. O. Yoshida (1972):

Separation of cells according to surface
antigens by the use of antibody-coated
columns. Fractionation of cells carrying immuno-
globulins and blood group antigens.

Scand. J. Immunol. 1, 75-87

Wilson, A.B. und R.R.A. Coombs (1973):

Rosette formation between guinea pig
lymphoid cells and rabbit erythrocytes,
a possible T-cell marker.

Int. Arch. Allergy 44, 544-525

Zeiller, K. und G. Pascher (1973):

Detection of T and B cell- specific
heteroantigens on electrophoretically
separated lymphocytes of the mouse.

Eur. J. Immunol. 3, 614-618

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. Mayr danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Blutgruppen- Resistenzforschung in München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. O. Schmid für die Überlassung des Themas und hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Cwik danke ich für die liebenswürdige Hilfe und wertvolle Diskussionen.

Für die blutgruppenserologischen Untersuchungen bedanke ich mich bei Herrn Tierarzt L. Erhard.

Allen Mitarbeitern des Blutgruppeninstituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, besonders Frä. Gebhard und Frau Pfeffer, danke ich für die technische Unterstützung.

Herrn Dr. Haeger, Leiter der Prüf- und Besamungsstation Grub bei München, danke ich für die Überlassung von Blutproben.

Herrn Professor Dr. Bogner, Direktor der Bayerischen
Landesanstalt für Tierzucht in Grub, danke ich für
die zur Verfügung gestellten Rinderfamilien.

Lebenslauf

26.11.49	Geburt in Scheßlitz, Kreis Bamberg;
1956	Eintritt in die Volksschule;
1957	Umzug nach München
1962	Übertritt an das Pestalozzi-Gymnasium;
1970	Abitur;
1970/71	Ableistung der allgemeinen Wehrpflicht;
1971	Immatrikulation an der Ludwig-Maximilians- Universität, München;
1977	Bestehen der tierärztlichen Prüfung;
1977	Beginn der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit;
1977	Approbation als Tierarzt;
1978	Seit 1.7.78 als Tierarzt tätig;

